

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792021

研究課題名(和文) 視神経再生に関与する特異的マクロファージの探索

研究課題名(英文) Neutrophils Express Oncomodulin and Promote Optic Nerve Regeneration

研究代表者

栗本 拓治 (KURIMOTO, Takuji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：50388815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：視神経再生因子であるオンコモジュリンの早期産生には、マクロファージよりも好中球が重要であることを明らかにした。また、好中球の中和抗体である抗Ly6G抗体を眼球内へ投与すると、好中球の浸潤が抑制されオンコモジュリンも減少し、視神経の再生効果も著しく減少していた。一方、神経保護効が知られているCiliary neurotrophic factor (CNTF)、Leukemia inhibitory factor (LIF)などの発現量には変化が認められなかった。この結果から、好中球は視神経再生を促進するが、神経保護には寄与していない可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We show here that neutrophils, the first responders of the innate immune system, play a central role in inflammation-induced regeneration. Numerous neutrophils enter the mouse eye within a few hours of inducing an inflammatory reaction and express high levels of the atypical growth factor oncomodulin (Ocm). Immunodepletion of neutrophils diminished Ocm levels in the eye without altering levels of CNTF, leukemia inhibitory factor, or IL-6, and suppressed the proregenerative effects of inflammation. A peptide antagonist of Ocm suppressed regeneration as effectively as neutrophil depletion. Macrophages enter the eye later in the inflammatory process but appear to be insufficient to stimulate extensive regeneration in the absence of neutrophils. These data provide the first evidence that neutrophils are a major source of Ocm and can promote axon regeneration in the CNS.

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼発生・再生医学

キーワード：視神経再生 視神経炎症

1. 研究開始当初の背景

視神経は一旦損傷されると再生することなく逆行性変性を起こし、その細胞体である網膜神経節細胞 (RGC) は細胞死に陥る。しかしながら、酵母の壁成分である Zymosan を眼内投与し、眼内炎を惹起させると、損傷された視神経線維を再伸長させることができる (Yin et al. *J Neurosci*, 2003)。申請者らは PTEN コンディショナルノックアウトマウス (PTEN CKO) の眼内に Zymosan と cAMP アナログ (CPT-cAMP) を同時投与すると、損傷した視神経が顕著に再生され、挫滅後 6 週目には多数の再生線維が視交叉を越えて、視床まで到達することを明らかにした (Kurimoto et al. *J Neurosci*, 2010)。より長期に観察すると挫滅後 12 週目においては、再生線維は視神経全長にわたって伸展し、視交叉上核、内側終止核、視蓋オリブ核、上丘の視覚中枢まで到達した。さらに視覚遮断による回避反応、視運動反射、概日リズムの行動レベルにおける機能回復が確認された (de Lima et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012)。これらの研究により、Zymosan による眼炎症、PTEN 遺伝子の抑制、cAMP アナログの併用 (3 者併用療法) は、これまで不可能と思われた視中枢への視神経再生を可能にすることが示された。一方、哺乳類の中樞神経系においては、外傷後に形成される癒痕組織 (主にグリア細胞) に発現する再生阻害因子が、神経軸索の再生を阻害することが知られている (Brudbary et al. *Nature*, 2002; Dickendisher et al. *Nat Neurosci*, 2012)。これは視神経でも同様であり、申請者が開発した 3 者併用療法と再生阻害因子の抑制を組み合わせることにより大きな再生効果が得られる可能性があることから、本研究の提案に至った。

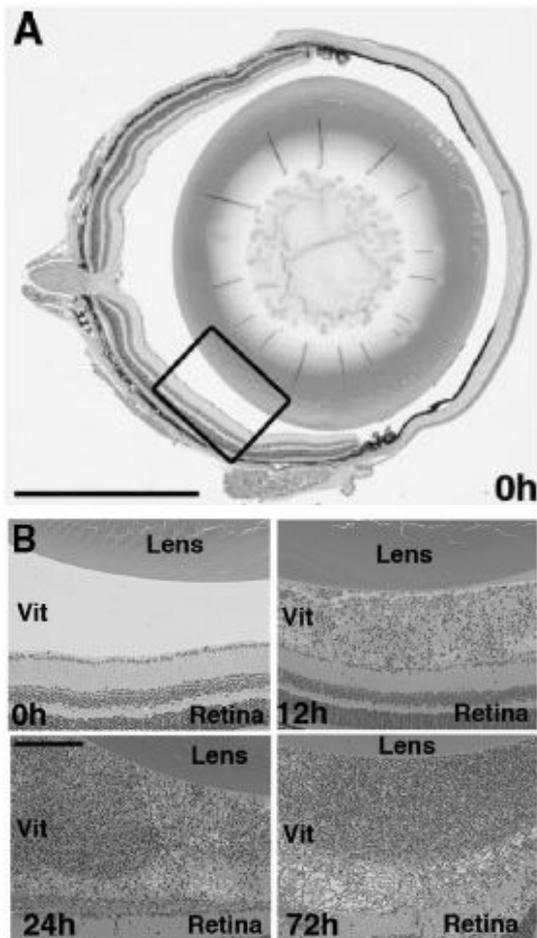
2. 研究の目的

本研究の目的は、視覚機能再建を目指した新しい視神経再生の手法を確立することである。そのために、主に以下の点を研究する。申請者らが見出した Zymosan の眼内投与による眼炎症、PTEN 遺伝子欠損による mTOR 経路の活性化、cAMP アナログの 3 者併用による視

神経再生療法を確立する。好中球に着目して、眼炎症による視神経再生の新たなメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

炎症誘発作用を持つ酵母細胞壁抽出物である Zymosan (12.5mg/ml) を野生型マウスの眼球へ投与し、12 時間、24 時間、72 時間後の組織の様子を観察した (図 1)。さらに硝子体を取り出して好中球の浸潤について FACS を用いて検討した。この時、浸潤する細胞が、好中球またはマクロファージのどちらが優位であるかを組織免疫染色法なども合わせて解析を行った。また、Zymosan 刺

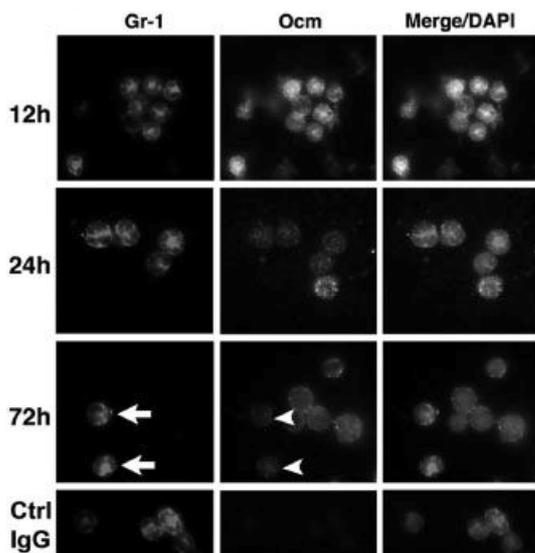


(図 1) Zymosan 刺激による炎症細胞の浸潤。無刺激のマウス眼球全体 (A) と Zymosan 刺激後 12, 24, 72 時間の硝子体 (B) のヘマトキシリン・エオジン染色。刺激 12 時間後に好中球を含む炎症細胞が硝子体中に集積していることが分かる。

激後の硝子体から好中球を精製し、視神経再生因子の1つであるオンコモジュリンの発現を細胞免疫染色および定量PCRなどにより解析した。

4. 研究成果

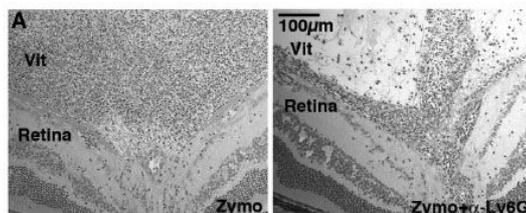
炎症誘発作用を持つ酵母細胞壁抽出物であるZymosan (12.5mg/ml) を野生型マウスの眼球へ投与し、12時間、24時間、72時間後に硝子体を取り出して好中球の浸潤についてFACSを用いて検討した。その結果、マクロファージの浸潤よりも早期に好中球が硝子体へ浸潤していた。さらにZymosan刺激後に硝子体から精製した好中球では、視神経再生因子の1つであるオンコモジュリンの発現が細胞免疫染色により認められた。好中球によるオンコモジュリンの産生量はZymosan刺激の12時間後にすでにピークに達しており(図2)マクロファージと比較して非常に早いものであ



(図2)硝子体中のGr-1陽性細胞(好中球)は、Zymosan注入後早期(12時間)からOcmを発現している。

った。この結果から、視神経再生因子であるオンコモジュリンの早期産生には、マクロファージよりも好中球が重要であることが示された。さらに、Zymosan刺激では神経保護効果に重要な因子の発現が増大することが知られているため、好中球と神経保護の関連を検討した。好中球の中和抗体である抗Ly6G抗体を

眼球内へ投与すると、やはり好中球の浸潤が抑制され、オンコモジュリンも減少し、視神経の再生効果も著しく減少していた。しかしながら神経保護効が知られているCiliary neurotrophic factor (CNTF)、Leukemia inhibitory factor (LIF)などの発現量には変化が認められない。この結果から、好中球は視神経再生を促進するが、神経保護には寄与していない可能性が考えられた。これらの成果はJournal of Neuroscience誌に掲載された。



(図3)抗Ly6G抗体による好中球の浸潤抑制.Zymosanによる浸潤細胞の集積(左).抗Ly6G抗体の投与はZymosanによる浸潤細胞の集積を抑制した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. Reinnervation of central visual areas and recovery of visual functions following optic nerve regeneration in adult mice.
Koriyama Y, Kurimoto T, de Lima S, Benowitz L.
Brain Nerve. 2014 Mar; 66(3):265-72.
Japanese.
査読あり
2. Neutrophils express oncomodulin and promote optic nerve regeneration.
Kurimoto T, Yin Y, Habboub G, Gilbert HY, Li Y, Nakao S, Hafezi-Moghadam A, Benowitz LI.
J Neurosci. 2013 Sep 11;33(37):14816-24.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.5511-12.2013.

査読あり

3. Involvement of P2X (7) receptors in retinal ganglion cell death after optic nerve crush injury in rats.
Kakurai K, Sugiyama T, Kurimoto T, Oku H, Ikeda T.
Neurosci Lett. 2013 Feb 8;534:237-41.
doi: 10.1016/j.neulet.2012.11.060.
査読あり

〔その他〕

ホームページ等

公益財団法人東京都医学総合研究所

<http://www.igakuken.or.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗本 拓治 (KURIMOTO Takuji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・

感覚システム研究分野・研究員

研究者番号 : 50388815

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし